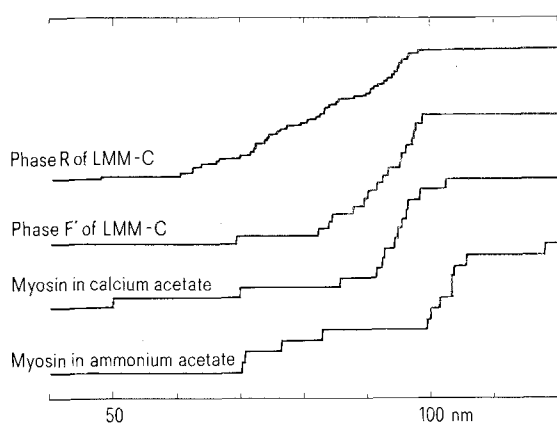


Samples of the aggregates suspended in their dialysis solutions were digested at 20°C with trypsin in a 1:255 mass ratio to myosin or 1:92.2 to LMM-C. Another sample of myosin segments was transferred to 0.5 M ammonium acetate prior to digestion to study the effect of salt composition. Aliquots removed after varying times were quenched with chilled solutions of soybean trypsin inhibitor, and specimens were mounted, negatively stained, and examined in the electron microscope¹⁶.

The Figure summarizes for the different digestions the distances of scission loci from the overlap margins, i.e., the lengths of the residual light-meromyosin fragments.



Cumulative frequency graphs of the distances from the C-termini of the molecules to scission sites in tryptic digestions of segment structures of myosin and LMM-C.

To avoid the artifact-prone grouping of measurements into ranges, the data are plotted as cumulative frequency graphs, rather than as histograms. Each unit step in a broken line corresponds to one datum, and the step heights are inversely proportional to the total number of measurements in each series, so that average slopes reflect the densities of data points.

The digestions of myosin show a single site of predominant attack in each solvent, but the sites differ: 103 ± 2 nm from the C-terminus in ammonium acetate solution, but 95 ± 2 nm in calcium acetate. While very close sites cannot be distinguished, Student's *t*-test suggests that the 95-nm and 103-nm sites differ significantly at better than the 0.1% level. The remaining scission sites for myosin mostly cluster about 70 nm or 85 nm, with one scission at 103 nm in calcium acetate. All of this fits with the observation⁷ that brief tryptic digestion of dissolved myosin yields light-meromyosin molecules about 90 nm long, but 70 nm long upon further digestion.

The digestion of phase F' of LMM-C in calcium acetate largely matches that of myosin in the same solvent, but with less clearly demarcated scission at the 95-nm site, which lies near the N-terminus of LMM-C. Thus the type of solvent is the major factor governing specificity of attack.

In great contrast, the digestion of phase R of LMM-C shows a great loss of specificity of attack. A wide range of sites throughout the hinge region is rapidly cleaved. Thus, calcium butyrate has rendered susceptible many additional sites within the hinge region. This fact, combined with the observation that LMM-C yields ordered, though aberrant aggregates in calcium butyrate solution, suggests that this salt induces an alteration in the LMM-C molecule that is limited to the hinge region.

Anaerobe Aktivierung von Katalase (EC 1.11.1.6) in Gegenwart von Monodehydro-L(+)-ascorbat

Anaerobic Inactivation of Catalase (EC 1.11.1.6) in the Presence of Monodehydro-L(+)-ascorbate

W. VOGT und W. WEIS

Zentrum für Biochemie am Klinikum der Justus Liebig-Universität, Friedrichstrasse 24, D-63 Giessen (Bundesrepublik Deutschland, BRD), 8. März 1976.

Summary. Catalase is partially inactivated irreversibly in anaerobic solutions containing together L(+)-ascorbate, monodehydro-L(+)-ascorbate, and dihydro-L(+)-ascorbate. The experiments indicate that monodehydro-L(+)-ascorbate inactivates catalase.

ORR¹⁻⁴ hat die lange bekannte unter *aeroben* Bedingungen zur Inaktivierung von Katalase durch L(+)-Ascorbat führende Reaktion auf molekularer Ebene untersucht und zuletzt^{2,3} beschrieben, dass unter aerober Inkubation der Katalase mit L(+)-Ascorbat oder L(+)-Ascorbat und Kupferionen (pH 7,0) entstehende Hydroxyl- oder Perhydroxylradikale das Apoprotein der Katalase je nach Bedingungen unterschiedlich verändern. Die Literatur zu diesem Problem ist in den Arbeiten¹⁻⁴ ausführlich dargestellt. Bislang ist noch nicht untersucht worden, ob nicht L(+)-Ascorbat, Monodehydro-L(+)-ascorbate oder Dihydro-L(+)-ascorbate, Substanzen, die bei den in der Literatur mitgeteilten Experimenten immer nebeneinander vorliegen, unter *anaeroben* Bedingungen Katalase inaktivieren.

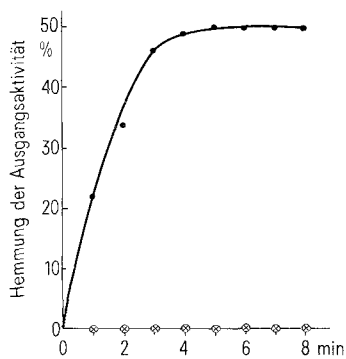
Material und Methoden. Reine kristalline Dihydro-L(+)-ascorbinsäure wurde nach dem Verfahren von STAUDINGER und WEIS⁵, Monodehydro-L(+)-ascorbate

durch Komproportionierung von L(+)-Ascorbat und Dihydro-L(+)-ascorbate, wie bei VON FOERSTER et al.⁶ beschrieben, hergestellt. Extrem reiner Stickstoff der Fa. Messer, Griesheim, wurde mit dem Oxisorbsystem der gleichen Firma nachgereinigt. Wasser wurde deionisiert und zweimal in einer Quarzapparatur destilliert. Die übrigen Chemikalien waren analysenreine Handelsprodukte. Die Vorinkubation der Katalase erfolgte bei 25°C in einer Stickstoffatmosphäre. Das Schutzgas strömte mit $120 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ über die in einem Überdruckventil verschlossenen Kolben befindliche Reaktionslösung. Zur Feststellung der katalatischen Aktivität der Katalase bestimmten wir die anfängliche Reaktionsgeschwindigkeit der Zersetzung von Wasserstoffperoxid durch Katalase bei 25°C. Ausser bei der Untersuchung der pH-Abhängigkeit der Reaktion wurde bei pH 7,0 gearbeitet. Es wurde die Abnahme der Extinktion bei 240 nm Wellenlänge in einem UV-Spektralphotometer SP 800 A mit

dem Zusatzgerät SP 820 zur Registrierung bei fester Wellenlänge (Fa. Unicam Instruments LTD, Cambridge/England) unter geringfügiger Modifizierung des von ORR⁴ abgewandelten Verfahrens von CHANCE⁷ registriert. Die Vergleichsküvette enthielt den bei den Experimenten verwendeten Phosphatpuffer von pH 7,0. Die Wasserstoffperoxidkonzentration wurde auf ungefähr 18 mM eingestellt, was bei pH 7,0 einer Extinktion von um 0,8 entspricht. Gestartet wurde die Reaktion durch Zugabe von einer jeweils frisch bereiteten wässrigen Lösung des zu zersetzenden Wasserstoffperoxids.

Ergebnisse. 1. pH-Optimum: Man findet ein breites pH-Optimum zwischen pH = 6,0 und pH = 7,0.

2. Kinetik der Hemmung bei pH 7,0: Inkubiert man Katalase anaerob in Gegenwart von Monodehydro-L(+)-ascorbat, so wird sie bei gleicher Molarität von L(+)-



Kinetik der Hemmung von Katalase durch Monodehydro-L(+)-ascorbat (●●●), sowie Einfluss von L(+)-Ascorbat (○○○) und Didehydro-L(+)-ascorbat (×××) auf die katalatische Aktivität der Katalase. Katalase 8 µg in 50 ml, L(+)-Ascorbat und Didehydro-L(+)-ascorbat jeweils 10⁻⁴ M, 0,01 M Phosphatpuffer, pH 7,0, 25 °C. Messvolumen 2,5 ml, davon 2,45 ml des Inkubationsansatzes 0,392 µg Katalase und 0,05 ml einer 0,45 M Wasserstoffperoxidlösung enthaltend. Mittelwerte aus 8–12 Messungen, maximale Abweichung ± 2%.

Ascorbat und Didehydro-L(+)-ascorbat im Ansatz innerhalb weniger Minuten zu 50% gehemmt. Inkubiert man Katalase unter den gleichen Bedingungen mit L(+)-Ascorbat, so wird sie selbst nach 3 h nicht inaktiviert. Didehydro-L(+)-ascorbat allein vermag ebenfalls Katalase nicht zu inaktivieren. Die Figur zeigt die Kinetik der Hemmung über 8 min.

3. Irreversibilität der Hemmung: Die Hemmreaktion wird nicht mehr beobachtet bei Konzentrationsverhältnissen von L(+)-Ascorbat:Didehydro-L(+)-ascorbat von jenseits 40 und 0,025. Maximale Hemmung der Katalase findet man beim Verhältnis von L(+)-Ascorbat:Didehydro-L(+)-ascorbat von 1. Dies wird auch bei von den in der Legende zur Figur unterschiedlichen Konzentrationen gefunden. Hemmt man die Katalase maximal und stellt anschließend durch Zugabe von fester L(+)-Ascorbinsäure oder fester Didehydro-L(+)-ascorbinsäure ein anderes Konzentrationsverhältnis ein, so bleibt die Hemmung selbst nach zweistündiger Inkubation bei 25 °C maximal.

Diskussion. Durch die mitgeteilte Reaktion ist erstmals gezeigt, dass eine Enzymaktivität durch das Radikalanion Monodehydro-L(+)-ascorbat verändert wird. Es ist zu erwarten, dass die Aktivitäten weiterer Enzyme durch Monodehydro-L(+)-ascorbat beeinflusst werden. Der Mechanismus der hier beschriebenen Reaktion bedarf der Klärung.

¹ C. W. M. ORR, Biochem. biophys. Res. Commun. 23, 854 (1966).

² C. W. M. ORR, Biochemistry 6, 2995 (1967).

³ C. W. M. ORR, Biochemistry 6, 3000 (1967).

⁴ C. W. M. ORR, in *Methods in Enzymology* (Eds. S. P. Colowick und N. O. Kaplan; Academic Press, New York und London 1970), Vol. 18, p. 59.

⁵ H. J. STAUDINGER und W. WEIS, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 337, 284 (1964).

⁶ G. V. FOERSTER, W. WEIS und H. J. STAUDINGER, Justus Liebigs Annln Chem. 690, 166 (1965).

⁷ B. CHANCE, in *Methods of Biochemical Analysis* (Ed. D. Glick; Interscience Publishers, Inc., New York, Interscience Publishers LTD., London 1957), Vol. 1, p. 412.

The Relative Distribution of Soluble and Insoluble Cholinesterases in Rat Excitable Tissues

J. M. VARELA and P. MANDEL

Centre de Neurochimie, Faculté de Médecine, 11, rue Human, F-67085 Strasbourg Cédex (France), 24 February 1976.

Summary. Three ratios were studied here: bound to free AChE (R_1), bound to free BChE (R_2), and the ratios between these two (R_3). The first one proved relevant in that it contributed to the division of the cholinergic tissues into 3 classes: high values (nicotinic tissues: skeletal muscle), low values (muscarinic tissues: small intestine, uterus, heart), and middle values (mixed, nicotinic and muscarinic cholinergic innervation: brain). The third ratio (R_3) showed different values in the muscarinic tissues studied; no significant differences could, however, be found between the ratios of brain and skeletal muscle. Further exploration of this ratio should indicate whether it is of some importance for the characterization of excitable tissues.

Cholinesterases, acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) occur in two native (free and bound) states in mammalian tissues¹⁻⁴, but it is still not clear whether this is also true for other species. It has been reported that the enzyme is solubilized almost completely by means of saline media in some electrical fishes, for example (see discussion in ²). Recently, however, it was found that even in the electroplax of *Electrophorus*, when Triton X-100 is added to the current aqueous or saline media, more enzyme is released than with these

extraction solutions alone⁵. One may ask whether the fraction of the enzyme, which seems to be linked to the

¹ J. M. VARELA, Experientia 29, 1437 (1973).

² J. M. VARELA in *Isozymes II-Physiological Function* (Ed. C. MARKERT; Academic Press, New York 1975), p. 315.

³ C. H. S. McINTOSH and D. T. PLUMMER, Biochem. J. 133, 655 (1973).

⁴ J. S. KANGIEL-KRAMSKA and S. NIEMIERKO, J. Neurochem. 24, 1135 (1975).

⁵ Y. DUDAI and I. SILMAN, J. Neurochem. 23, 1177 (1974).